

Stavrianopoulos et al., Serial No. 08/486,070 (Filed June 7, 1995)
Exhibit 9 [Fifth Supplemental IDS -- February 6, 2006]

EXHIBIT 9

Enz-7(P)(C3)

別冊

蛋白質核酸酵素

核酸実験法 下

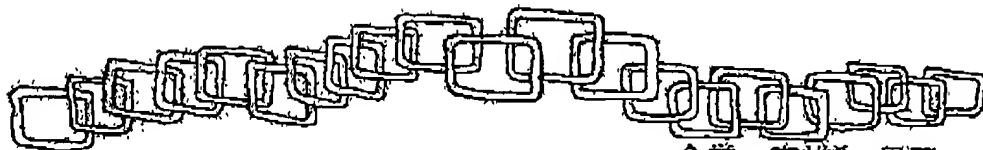
METHOD
IN
NUCLEIC
ACID
RESEARCH

1973

共立出版株式会社

メンブランフィルターを用いた

DNA-DNA hybridization 法



今榮 廣雄* 黒田 律**

はじめに

DNA の二本鎖を *in vitro* で分離、再会合させることが可能になって以来、genetic homology について、DNA レベルで調べることができるようになった。また、DNA-DNA hybrid 形成の特異性を利用して、多量の DNA 混合物中の特定の DNA についての解析が容易に行なえるようになった。

DNA-DNA hybridization のいろいろな方法が開発されているが、その主なものは、McCarthy らの DNA-agar 法¹⁾と、Denhardt らのメンブランフィルター法²⁾である。前者は DNA を多量に必要とするので、細菌やファージ DNA を用いる研究には向かない。一方、後者は、少量の DNA でよいと、操作が簡便で一度に多量の試料を扱えることなどすぐれているが、DNA を多量に用いることが困難であるので、動物細胞の系のようにゲノムサイズの大いものの解析には利用しにくい。ここでは、ファージと細菌の系に主眼をおいて、筆者の研究室で行なっているメンブランフィルターを用いる方法を中心にすることにする。

なお、核酸どうしのアニーリングに関する特許として、McCarthy と Church によるもの³⁾と Midgeley⁴⁾および、De Ley⁵⁾によるものがあるので参照されたい。

1. DNA の renaturation の基本的性質

DNA 鎖の reassociation は、2つの負に荷電したポリヌクレオチド鎖どうしの反応であるため、カチオンの濃度が高いほど反応は速く進行する。この場合、塩濃度が高いと T_m (DNA 融解温度) が上昇するので、一般に反応温度も高める必要がある。さらに、pH、粘度、

DNA 鎖の長さやゲノムの大きさなどにも依存する。繰り返しのない DNA での溶液中の renaturation kinetics に関する理論的基礎および、種々の要因の影響について、Wetmeyer と Davidson の詳細な報告¹⁰⁾があるので、まずはじめに、その主な点を含めて、DNA-DNA hybrid 形成反応の基礎的な性質を紹介する。メンブランフィルターを用いた場合も、一、二の点を除いて基本的には同じ反応形式をとると考えてよいので、個々の実験の場合の条件設定の参考にしていただきたい。

1. 反応様式

DNA の renaturation の反応は二次反応の様式で進行する。すなわち、相補的な DNA 鎖が衝突し最初の有効な塩基対が形成される段階が律速段階になる。続いて起こる二本鎖の完成への "zippering" 反応は非常にすみやかに進行する。

溶液中の一本鎖 DNA の濃度を P で表わすと、renaturation 反応が二次反応に従うものとすれば、次式が成り立つ。

$$-\frac{d(P)}{dt} = k \frac{(P)^2}{2} \quad (1)$$

(t : 反応時間, k : renaturation 反応の速度定数)

積分して、一本鎖 DNA の初濃度を P_0 、時間 t における濃度を P とすれば、

$$\frac{P_0}{P} = \frac{k P_0}{2} t + 1 \quad (2)$$

となる。

実験的に、 P_0/P が反応時間に対して直線性を持つこと、速度定数 k が DNA の初濃度の違いによって変化しないことが示され¹⁰⁾、DNA の renaturation が二次反応に従うことが証明されている。

2. 温度の影響

renaturation 反応の速度定数 k は、図 1* に示したような温度依存性を示し、一般に $(T_m - 25^\circ\text{C})$ の付近で最大となる。

3. DNA 断片の大きさの影響

一本鎖 DNA 分子の平均のヌクレオチド数を L とすると、経験的に $k \propto \sqrt{L}$ が成り立つ。したがって、溶液中

* Yagoo Imae, 名古屋大学理学部分子生物学研究施設(名古屋千種区不老町)

** Rihai Kuroda, 愛知学院大学薬学部生理学教室(名古屋千種区栄盛通)

Membrane filter technique for DNA-DNA hybridization

* 図 1, 図 5, 図 6 および図 7 は、Wetmeyer と Davidson の論文¹⁰⁾中の要点を図に示したもの。種々の条件の違いを無視してプロットしてある点に注意されたい。

メンブランフィルターを用いた DNA-DNA hybridization 法

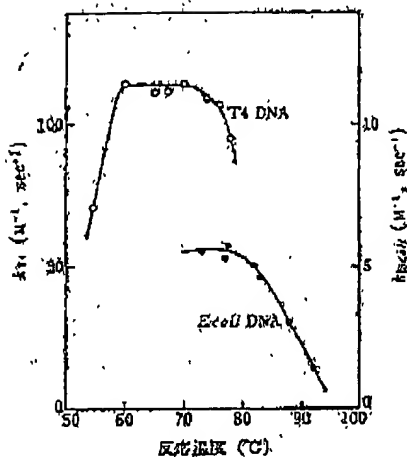


図 1. renaturation の温度依存性
 反応液は 1.0M Na⁺ の条件で行なわれている
 T_m T4 DNA = 92°C
 T_m E. coli DNA = 98°C

で反応させる場合は DNA 鎖が短いほど、反応速度が大となる。一方、後述するメンブランフィルター法では、加えた標識 DNA の溶液中での self-annealing を最小にするために逆に L を小さくする処理を行なう。

DNA の hybrid 形成能は、12 スクレオチド以上の鎖長が必要で、さらに、特異性を示すためには T4 DNA の場合、17 スクレオチド以上の鎖長が必要となる¹¹⁾。また、温度が低いと特異性が弱く(図2)、鎖長があまり短いと T_m が下りすぎて高温でのアニーリング反応

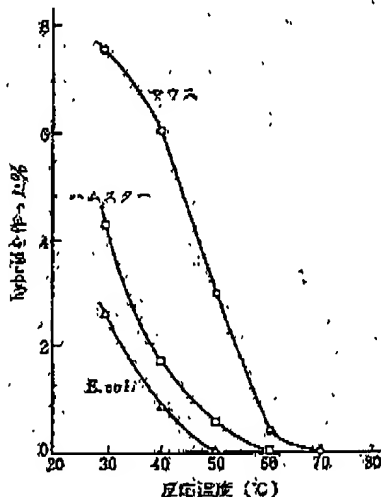


図 2. renaturation の温度と特異性¹¹⁾
 100µg の T4 DNA (33 スクレオチドの大きさ) 0.4 µg を 100µg の SV40, ハムスター, E. coli の DNA と 1 時間反応させた。反応液は 0.5M KCl-0.01M Tris 緩衝液 (pH 7.0)

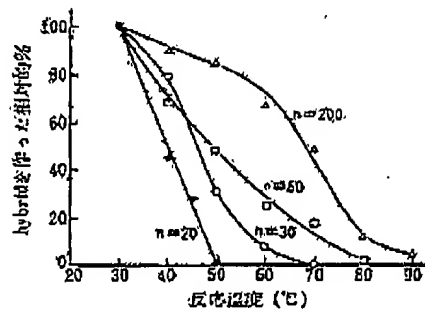


図 3. DNA 断片の大きさと反応性¹¹⁾
 100µg の T4 DNA に対して、大きさを変えた ³²P-ラベル DNA (0.1 µg) を加えて反応させた。n: スクレオチドの塩基数

の効率が悪くなる(図3)。したがって、特異性をきちんと持たせ、反応をすみやかにさせるには、DNA 鎖は少なくとも、200 スクレオチド以上の長さを持たせるべきであろう。

4. ゲノムの大きさと GC 含量の影響

同じ DNA 濃度でも、細菌の DNA よりファージ DNA のほうが、renaturation の速度が大である¹²⁾。ゲノムあたりの塩基対の数を N とすると、 k_{rel}/N なる関係が成り立つ。図4は、種々の DNA について、反応速度定数の値をゲノムサイズに対してプロットしたもので、上の関係が成立していることがわかる。したがってゲノムサイズの大きい DNA を扱うときには、反応時間を長くするか、DNA 濃度を増すか、いずれかの対策を講じる必要がある。

また、ゲノムサイズは同程度でも、GC 含量の大きい DNA は、反応速度が大で、GC 含量 34, 41, 50, 64

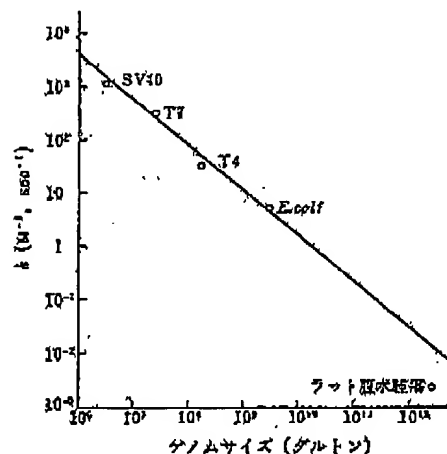


図 4. ゲノムの大きさと反応速度定数¹¹⁾
 用いた DNA はすべて、約 7S の大きさにしてある

% のとき、相対的な k の値は 0.69, 0.81, 0.98, 1.27 と大きくなる。したがって、renaturation 反応を時間的な経過で見ると、最初は GC 含量の高い DNA 断片から反応が起きていることがわかる。

5. pH, イオン強度および粘度の影響

renaturation は pH 7 付近で (図 5)、イオン強度は高いほど (図 6) 反応速度は大となる。また、反応液の粘度の上昇につれて k の値は小さくなる (図 7)。

II. DNA-DNA hybridization

メンブランフィルターを用いる DNA-DNA hybridization 法は、Gillespie と Spiegelman により DNA-RNA hybridization 法として開発されたもの¹³⁾を、DNA にも適用できるように改良したものである。一本鎖 DNA は RNA や二本鎖 DNA とちがってメンブランフィルターによく吸着する。したがって、hybridization の反応中に一本鎖 DNA がメンブランフィルターへ非特異的に吸着するのを防ぐことが必要である。Denhardt は一本鎖 DNA を固定したメンブランフィルターをあらかじめアルブミンおよび合成ポリマーで被覆してから hybridization 反応を行ない、溶液中の一本鎖 DNA の非特異的吸着を除いた。Legault-Demare¹⁴⁾ は、シメチルスルホキシド中で hybridization を行ない、非特異的吸着を防いだ。また、Warnant と Cohen¹⁵⁾ は、hybridization の後、フィルターを低イオン強度で、かつ高い pH の緩衝液で洗浄して非特異的に吸着した DNA を洗い去りバックグラウンドを下げている。この三つの方法についてはすでに詳しい紹介がある¹⁶⁾のでそれを参照されたい。ここでは、筆者らの行なっている Denhardt 法をさらに改良した方法について述べる。

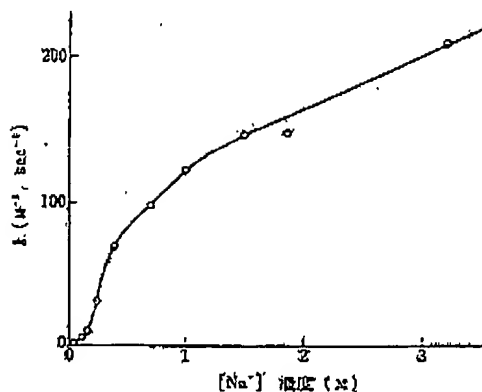


図 6. renaturation 反応に対するイオン強度の影響¹²⁾
図 5 と同じ条件 (pH は 7.0) で反応させた

1. DNA の調製

A. メンブランフィルターに固定する DNA

細菌の DNA は Marbur 法¹³⁾, Thomas 法¹⁴⁾あるいは両者を組み合わせた方法で抽出する。RNA, 蛋白質はできるだけ除去する。ファージの DNA はフェノール抽出¹⁷⁾によって調製する。

B. 反応液に入れる DNA

放射活性のある DNA を用い、放射能で追跡するので、DNA として純粋である必要はない。RNA が拮抗作用を起こすとはいついては困る。蛋白、脂質などは反応に影響しない。したがって、細菌からアルカリと表面活性剤で抽出した DNA をシメチル濃度勾配速心で分画した後、透析でシメチルを除いただけですぐ使用することも可能である。試料 DNA は、使用直前に熱処理などにより一本鎖にしておく。

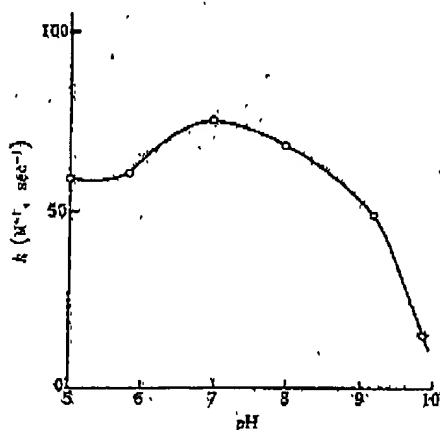


図 5. renaturation 反応の pH 依存性¹²⁾

T4 DNA (20 S) を $0.4 \times 10^{-3} \text{ M}$ 存在下で反応させた。温度は 25°C ($T_m = 25^\circ\text{C}$)

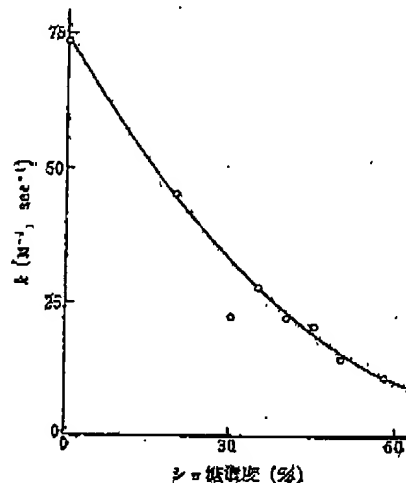


図 7. renaturation 反応に対する粘度の影響¹²⁾
図 6 と同一条件

メンブレンフィルターを用いた DNA-DNA hybridization 法

2. DNA のメンブレンフィルターへの固定

準備するもの: $10\times$ SSC ($10\times$ 濃度の SSC, SSC は $0.15M$ NaCl- $0.015M$ 核酸ナトリウム)。メンブレンフィルター: 直径 $20\sim 25mm$, Millipore HA 0.45 μ , Schleicher-Schneil Type B-6 coarse または Sartorius membranfilter MF50。液体シンチレーションカウンタ用ガラスバイアル (以後バイアルという)。

方法: 二本鎖 DNA は $0.1\times$ SSC 中で $100^\circ C$, 5 分加熱処理し、緩冷して一本鎖にする。このとき DNA 濃度を可能なかぎり薄くして、renaturation を少なくする。一定量を取り、 $8\times$ SSC 濃度にし、体積を $3\sim 5$ ml にする。あらかじめ $8\times$ SSC 中に浸しておいたメンブレンフィルターを用いてゆっくり通過する。流速は 3 ml/30 秒くらいでよいが、DNA の分子量が 6×10^5 ダルトンよりも小さいときは通過を非常にゆっくり (3 ml/10 分以上) にしないとフィルターへの吸着効率が低下する。フィルターを 5 ml の $8\times$ SSC で上と同じ速度で洗滌後、バイアルに移し一夜デシケーター中でシリカゲル上減圧下に乾燥させる。フィルターはバイアルのまま真空乾燥器で減圧下で $80^\circ C$, 2 時間処理し、DNA をフィルターに焼きつける。真空乾燥器がないときは、普通の乾燥器で $80^\circ C$, 2~3 時間熱処理し、すぐにデシケーターに移し、シリカゲル上で冷却させてもよい。DNA を固定したフィルターは乾燥状態で保存するかぎり、長期にわたって使用可能である。

3. ブレインキューベーション

準備するもの: PM; 0.02% フォール (Pharmacia, 平均分子量 $400,000$), 0.02% ポリビニルピロリドン (PVP) (Sigma, 平均分子量 $360,000$), 0.02% ウシ血清アルブミン (BSA) (Sigma, Fraction V), 0.05% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を $3\times$ SSC 中に溶かしたもの。

方法: DNA-フィルターを入れたバイアルに 1 ml の PM を加え、完全にふたをして $65^\circ C$ の水浴に沈め 6 時間保温する。筆者らは、金網のカゴを作り直しをつけて沈めている。保温後はただちに DNA-DNA hybridization を行なわせるのが望ましいが、やむをえない場合は冷蔵庫 ($4^\circ C$) で一夜放置しても効率はそれほど下らない。

4. DNA-DNA hybridization

準備するもの: バイアル, $10\times$ PM; $3\times$ SSC 中に PM の 10 倍濃度のフォール, PVP, BSA, SDS を含むもの, $3\times 10^{-4}M$ Tris-塩酸緩衝液 (pH 9.4)。

方法: ブレインキューベート中に、あらかじめ別のバイアルに $70\mu l$ の $10\times$ PM と $630\mu l$ の標識した試料の一本鎖 DNA ($3\times$ SSC 中) を入れておく。ブレインキューベートしたフィルターをとり出し、バイアルの口でよく PM をぬきとった後、試料のはいったバイアルに移し、

前と同様の方法で $65^\circ C$, 12 時間保温する。保温後、フィルターを $3\times 10^{-4}M$ Tris-塩酸緩衝液 (pH 9.4) で 3 回すすぎ、さらに吸引しながらフィルターの両面を 50 ml ずつの同じ溶液で洗滌する。赤外線ランプで乾燥後、トリチウム系のシンチレーターを用いてカウントする。加えた標識 DNA の総カウント量は、低塩濃度の状態で直接フィルターに定量をのせ乾燥後同様に測定し求める。

5. 補足

A. メンブレンフィルターを用いた DNA-DNA hybridization 法も基本的には I で述べた溶液中の renaturation kinetics に従うので、ここでは改めて細かい条件などについてはふれない。ただ、図 8 に見られるように反応液の体積に大きな依存性を示すので、反応液はできるだけ少なく、フィルターが完全に浸るだけの量で下げたほうが効率がよい。

B. hybrid 形成能は、ゲノムサイズと self-annealing の程度によって決まる。ゲノムサイズが大きい場合には、反応時間とフィルターに固定させる DNA 量を増加させるとよい。図 9 は DNA 量を変化させたときの効率の変化とゲノムサイズの関係を示している。固定させる DNA 量が多いほどよいといっても、 $100\mu g$ DNA/フィルター以上になると最後の Tris-緩衝液での洗滌の速度が極端に低下し、時間がかかりすぎるので実用的ではない。効率を上げるためどうしても DNA 量を増やしたいときには、1 つのバイアルに何枚もの DNA-フィルターを加えるのも一法である。ただし、この場合は、全部のフィルターが完全に浸るように反応液量を増やす必

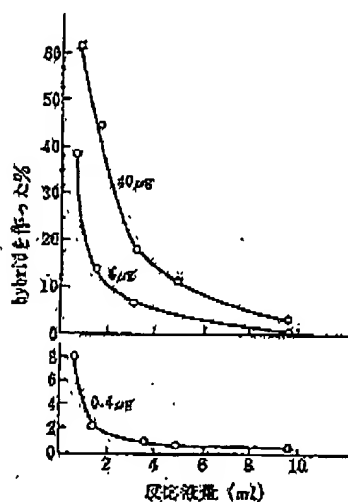


図 8. メンブレンフィルター法における反応液量の影響。T4 DNA を図に示されている量フィルターに固定してある。 ^{32}P -T4 DNA (管液処理したもの) を SSC 中、 $60^\circ C$, 25 時間反応させた。

別冊 蛋白質・核酸・酵素

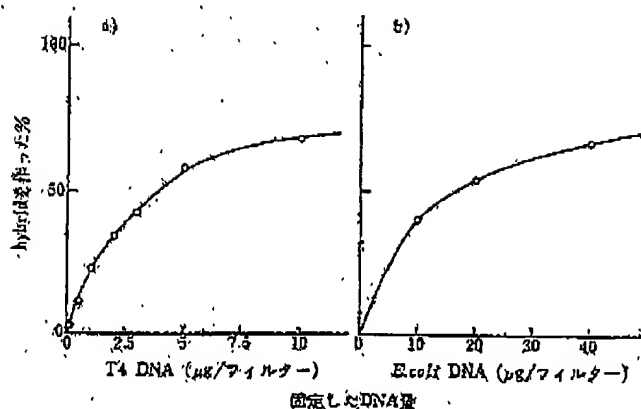


図 9. フィルターに固定した DNA 量と反応効率の関係

反応条件は本文参照。a) ^{32}P -T4 DNA: 0.1 μg , 952 cpm (大きさは 7~10 S)。b) ^{32}P -E. coli DNA: 0.05 μg , 1,600 cpm (0.5N NaOH で 100°C, 7 分処理したもの)。

要がある。表 1 に筆者らの研究室でとり扱った DNA の通常用いる固定量と hybridization の効率を示す。

C. 加えた標識 DNA の溶液中での self-annealing を防ぐためには、標識 DNA の量を固定した DNA 量に比してかなり少なくするか、標識 DNA を何らかの手段で低分子化するとよい。低分子化にはアルカリ処理が簡便である。分子量 $10^6 \sim 10^7$ ダルトンの DNA なら、0.5N NaOH 中で 100°C, 7 分間加熱すると $10^3 \sim 10^4$ ダルトンくらいの大きさになり、hybridization の効率も最もよくなる。表 2 はアルカリ処理の時間と DNA の大きさの変化を示している¹⁰⁾。アルカリ処理後、中和してから反応液に加える。

DNA の低分子化には、超音波処理も有効である。表 3 は超音波処理の場合の効率の変化を示している。

D. 反応液中に SDS を加えると、hybridization の効率には影響を与えないが、メンブレンフィルターがしなやかになり扱いやすくなる。また、バイアルのガラス壁の“ぬれ”がよくなり反応中にガラス壁に水滴が凝集

表 1. ゲノムサイズと hybridization の効率

固定した DNA	ゲノムサイズ (ダルトン)	μg/フィルター	% hybrid ^{a)}
PM2	5.9×10^6	2	75
P2	2.2×10^7	2	50~90
T7	2.5×10^7	2	80
φ80	3.0×10^6	2	63
λ	3.2×10^7	2	70
T4	1.0×10^8	2	35
E. coli	2.5×10^9	20	54
B. subtilis	4×10^9	20	55

a) ラベル DNA は $10^3 \sim 10^4$ ダルトンに断片化し、0.1 μg 以下の量で測定した

するために生ずる反応液の体積変化をなくすることができ、再現性が非常によくなる。比較的少ないカウントを用いても、duplicate したときのふれは±5% 以下となり、多くの点をとるような実験の場合には duplication は特に必要としない。この方法でのバックグラウンド (DNA を固定していないフィルターへの非特異的な吸着) は 0.1% 以下とみてよい。SDS を加えておくと、Warnaar と Cohen の方法ではバックグラウンドが 0.5% から 0.05% に低下する¹⁰⁾が、上述の方法では SDS の有無にかかわらず 0.1% 以下である。SDS を加えたときの欠点は、DNA のフィルターからの遊離が若干多くなる点であるが、多くの実験の場合無視できる程度である (SDS を

0.1% に加えると 60°C, 20 時間で固定した DNA の約 5% が遊離するという)¹⁰⁾。

E. ゲノムサイズが非常に小さい DNA を扱うときには、固定した DNA と、標識 DNA の量比を大きくしないと self-annealing が早くて hybridization の効率が低下する。

F. 経験的には、 3×10^{-4} M Tris-塩酸緩衝液 (pH 9.4) を作らなくても、Trizma base をそのまま蒸留水に溶かすと pH がほぼ 9.4 になるのでそのまま使用してもよい。

表 2. アルカリ処理の時間と DNA の平均の大きさ¹⁰⁾

処理時間 ^{a)}	DNA の平均の大きさ (ヌクレオチド) ^{b)}
0 分	14,000
3 分	2,500
7 分	410
15 分	150

a) 0.5N NaOH, 100°C 処理

b) アルカリ性シロキサン被覆度均一なシリカゲルを分画し、各分画にヌクレオチドのピークの位置をヌクレオチド数に直したものの

表 3. 超音波処理による hybridization 効率の変化^{a)}

処理条件 ^{a)}	% hybrid ^{b)}
未変性	0
アルカリ変性	15
超音波処理・アルカリ変性	35
超音波処理・熱変性	41

a) 超音波処理は MES Ultrasonic Disintegrator, 最大出力で 30 秒行なった

b) 標識した tDNA (0.05 μg , 850 cpm) を 1.5 μg フィルター上の DNA と hybridize させた

メンブレンフィルターを用いた DNA-DNA hybridization 法

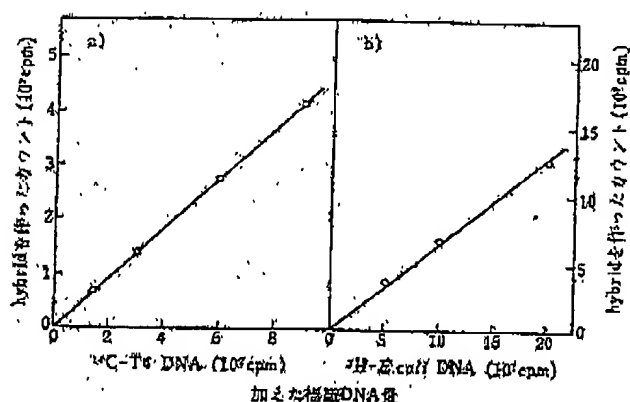


図 10. hybridization 反応の効率性

反応条件は本文参照。a) T4 DNA 2 μ g を固定してある。¹⁴C-T4 DNA: 750 cpm/0.16 μ g, b) E. coli DNA を 20 μ g 固定してある。³H-E. coli DNA: 2,000 cpm/0.025 μ g. DNA はいずれもアルカリ処理で断片化した

III. DNA-DNA hybridization の定量性と特異性: T4 および E. coli DNA を用いた実験例

1. 定量性

固定する DNA 量を一定にして、加える標識 DNA の量を変化させると、かなりの範囲において直線関係が成り立つ(図 10)。すなわち、充分量の DNA を固定しておけば、加えた標識 DNA が一定の効率で hybrid を形成する。T4 DNA の場合、2 μ g の DNA を固定すると、標識 DNA を 1 μ g 程度加えてもまだ直線関係が保たれているという例。

2. 特異性

図 11 は分離した E. coli DNA が固定した T4 DNA とほとんど hybrid を形成しないことを示している。すなわち、DNA-DNA hybridization の特異性は非常に

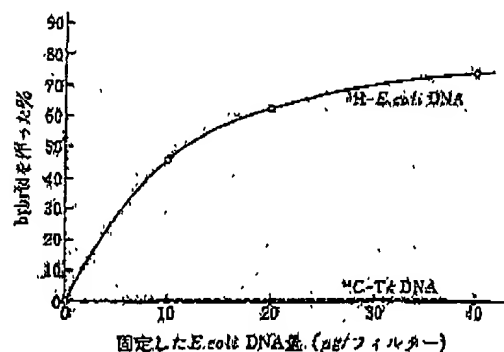


図 11. E. coli DNA と T4 DNA の相同性

E. coli DNA を固定したフィルターに ³H-E. coli DNA (2,000 cpm, 0.05 μ g) と ¹⁴C-T4 DNA (2,000 cpm, 0.36 μ g) を同じフィルターに加えて反応させた

高い。

図 12 は、競合の実験結果である。T4 DNA をフィルターに固定して、標識した T4 DNA を hybridize させるとき、ラベルしてない T4 DNA で競合させると、標識 DNA の hybridization の効率は著しく低下する。E. coli DNA で競合させても効率は変化しない。当然のことであるが、競合させる DNA 量は、標識 DNA の量に対してではなく、固定した DNA 量に基づいて算出する必要がある。

IV. その他の応用例

1. T4 DNA の分離した相補鎖の識別

III-2 で示した特異性は、単に種類の異なる DNA 間で認められるだけでない。T4 DNA の 2 本の相補鎖はポリ HG

との結合能の差を利用して CsCl 密度勾配遠心で分けられるが、この分離した DNA 鎖は、同じ DNA 鎖面分の間では hybrid を形成せず、特異的に相手方 DNA 鎖とのみ hybrid を形成する(図 13)²⁰。

2. λ dg DNA 中の細菌 DNA の定量

λ dg_{lys} DNA はその約 50% が λ DNA で、残りの約 50% はガラクトースオペロン近傍の E. coli DNA を組み込んでいることが遺伝的方法などで検定されている。標識した λ dg_{lys} DNA を、 λ DNA のみを固定したフィルターと、 λ DNA と λ dg_{lys} DNA を混合して固定したフィルターに hybridize させると、E. coli DNA と λ DNA の間に相同性がなければ両フィルターの差が組み込まれた E. coli DNA の大きさに対応するはずである。図 14 はその結果を示しているが²¹、差は約 30% で遺伝的方法などで出した値にはほぼ一致する。やや小さく出てい

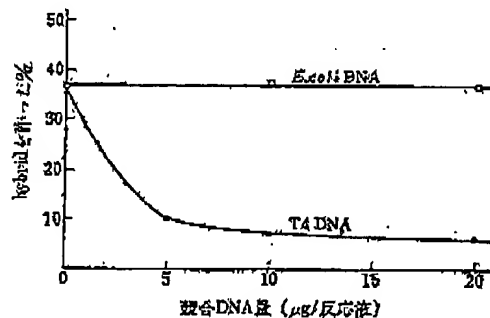
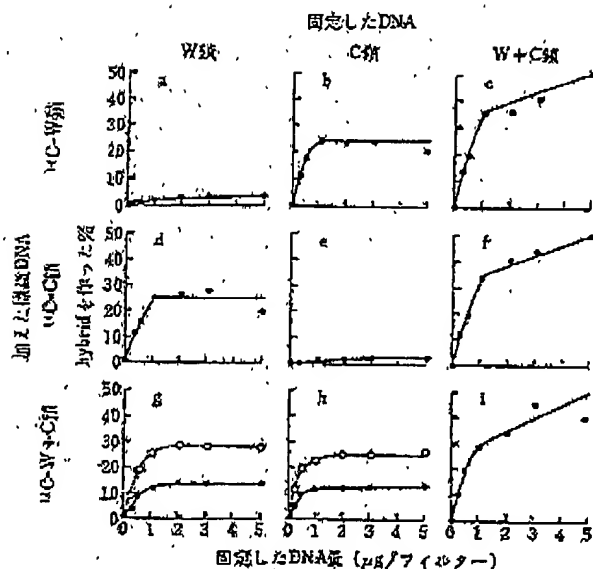


図 12. 競合 DNA の効果

T4 DNA 3 μ g を固定しておき、³H-T4 DNA 0.1 μ g と、未標識の T4 DNA または E. coli DNA を図の量加えて反応させた

別冊 蛋白質核酸酵素

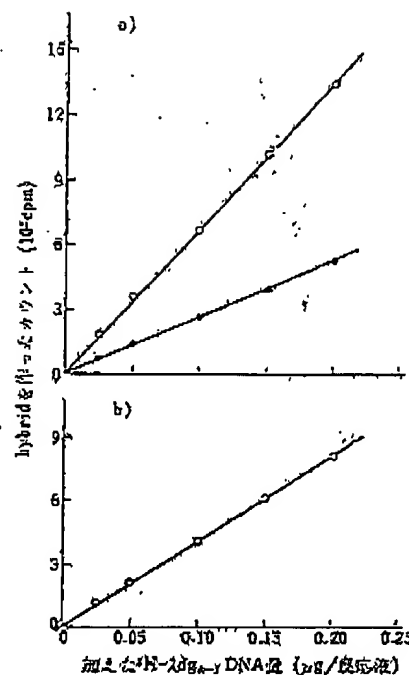
図 13. 鎖を分けた T4 DNA での hybridization⁴⁰⁾

ホリ UG を用いて、T4 DNA 鎖を C 鎖と W 鎖に分け、それぞれをフィルターに固定してある。¹⁴C-T4 DNA も同様に C, W 鎖に分けて、各 0.16 μg (730 cpm) を加え、hybridization を行なわせた。W + C 鎖は、両鎖を同時に加えたもの

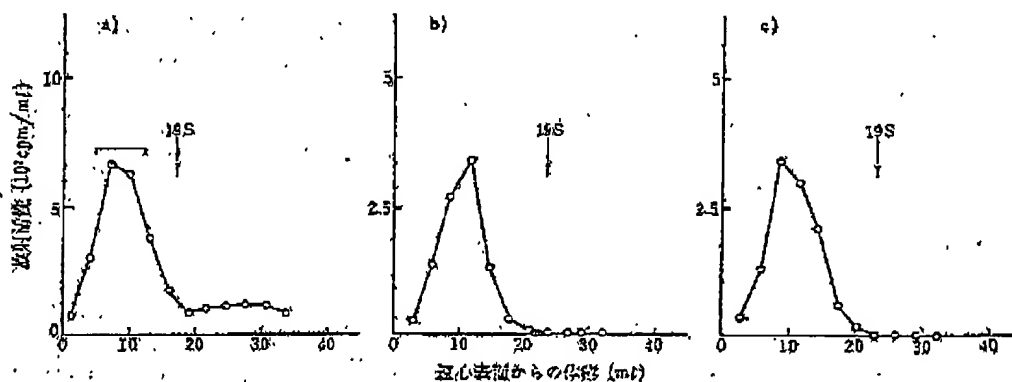
る理由は、実験系の問題とともに、λ DNA と *E. coli* DNA の間の部分的な相同性が存在するためである²⁴⁾。

3. DNA-DNA hybridization を用いての、特異的な DNA 鎖の分離

あらかじめ相補鎖に分離した DNA を固定し、それと hybrid を作る標識 DNA 鎖を分離することにより、標識 DNA 鎖を相補鎖に分けることができる²⁴⁾。T4 ウェッジ感染菌を ³²P-チミンで経時間ラベルし、DNA を

図 14. λ DNA 中に組み込まれた *E. coli* DNA の定量²⁴⁾

- a) —●—: λDNA 10 μg 固定。—○—: λDNA 5 μg と λ DNA 5 μg を固定。反応には、³²P-λ DNA (1,774 cpm/0.1 μg) と、20 Åg の融合 λ DNA を加えてある
b) λ+λ DNA フィルターに hybrid を作ったカウントから、λDNA フィルターに hybrid を作ったカウントを差し引いたもの

図 15. hybrid を作った標識 DNA のフィルターからの回収²⁴⁾

- a) T4 感染菌を ³²P-チミンでラベルし、DNA をアルカリ性ソニケーション法で分析したもの。グラフで示した部分を取り (〜10S)、T4 DNA の W 鎖および C 鎖と hybridize させた後、フィルターを溶法により洗浄する
b) W 鎖に hybridize したものを 0.1M NaOH-0.01M EDTA で洗出し、a) と同じ方法で分析したもの
c) C 鎖に hybridize したものを b) と同様にして分析したもの

モノブライアスとターミナル DNA-DNA hybridization 法

アルカリ性シロシ濃度勾配法にかけると、図 15-a のようなパターンが得られる。ピーク面分を線分、透析後 8 ml の反応液とし、DNA-DNA hybridization を行なわせる。30 枚のフィルターに T4 DNA の W 鎖のみを 2 μg ずつ固定し、他の 30 枚に C 鎖を 2 μg ずつ固定させる。反応液に全フィルターを加え (W と C を区別するためフィルターの一端を切っておくとよい)、hybridization 後前記に従って洗浄し、標識 DNA を 5 ml の 0.1 M NaOH-0.01 M EDTA に 10 分間浸して溶出する。各 W-フィルター、C-フィルターから溶出した DNA をもう一度、アルカリ性シロシ濃度勾配法で調べたものが、図 15-b, c である。10 S ぐらいの大きさの DNA を扱うかぎり、このような操作の間ではそれ以上の断片化は起こっていない。回収率は W, C 鎖についていずれも全カウントの約 20% である。

このような方法は、複製中の DNA のような "strand separation" の原理がうまく応用できないような材料をあつかうときとか、混合物中の特定の DNA の性質を調べたいときなどに非常に有効である。

お お り に

本 DNA-DNA hybridization 反応が 2 次反応式に従うことを利用して、その反応速度から DNA の相同性、特に 1 つのゲノム中での繰り返し数の数を測定する。いわゆる Cot 分析が最近特に発生学の分野などで広く使われるようになってきた。DNA の初濃度を C_0 とすると、反応は [2] 式から

$$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{1 + k C_0 t}$$

と表れる。

したがって、反応液中に単鎖で残っている割合 (C/C_0) は、初濃度と反応時間の積 ($C_0 \times t$) が 1/2 になったときちょうど半分となる。すでに述べたようにゲノムサイズで k が変動するが、 k の代わりに $C_0 t$ を単位として表わしても、同様の変化が追える。このように、 C/C_0 と $C_0 t$ を測定することによって、ゲノムサイズやゲノム中の繰り返し数の量を求める方法を Cot 分析と呼ぶ。くわしい方法などはすでに総説¹³⁾があり、また本書の巻末の稿 (74 ページ) を参照されたい。

文 献

- 1) E. T. Bolton, B. J. McCarthy: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 49, 1390 (1962)
- 2) B. J. McCarthy, E. T. Bolton: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 50, 156 (1963)
- 3) D. B. Cowie, B. J. McCarthy: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 50, 536 (1963)
- 4) S. Falkow, R. V. Ciccarella: *J. Mol. Biol.*, 12, 138 (1965)
- 5) D. T. Denhardt: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 23, 641 (1966)
- 6) J. Legault-Demare, B. Desseaux, T. Heyriag, S. Stron, G. P. Rns: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 28, 560 (1967)
- 7) S. O. Werners, J. A. Cohen: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 24, 554 (1966)
- 8) B. J. McCarthy, R. B. Church: *Ann. Rev. Biochem.*, 39, 131 (1970)
- 9a) J. E. M. Midgley: *Methods in Microbiology* (ed. J. R. Norris, D. W. Ribbons), 5A, 331, Academic Press (1971)
- 9b) J. DeLay: *ibid.*, 5A, 311 (1971)
- 10) J. G. Wrenner, N. Davidson: *J. Mol. Biol.*, 31, 349 (1968)
- 11) B. L. McCaughy, B. J. McCarthy: *Biochim. Biophys. Acta*, 349, 160 (1967)
- 12) J. Marmur, F. Doty: *J. Mol. Biol.*, 3, 583 (1961)
- 13) D. Gillespie, S. Spiegelman: *J. Mol. Biol.*, 12, 829 (1965)
- 14) 小田嶋一雄・本誌, 13, 1085 (1968)
- 15) J. Marmur: *J. Mol. Biol.*, 3, 208 (1961)
- 16) C. A. Thomas, Jr., K. L. Berns, T. J. Kelly, Jr.: *Procedures in Nucleic Acid Research* (ed. G. L. Cantoni, D. R. Davies), p. 535, Harper & Row Publishers, New York (1966)
- 17) C. A. Thomas Jr., J. Abelson: *Procedures in Nucleic Acid Research*, 同上 p. 563
- 18) 金森恵雄 (未発表)
- 19) 富山源二 (私伝)
- 20) 岡本浩二 (私伝)
- 21) K. Sugimoto, T. Okazaki, Y. Imai, R. Okazaki: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 63, 1343 (1969)
- 22) Y. Imai, T. Fukasawa: *J. Mol. Biol.*, 44, 585 (1970)
- 23) H. Yamagishi, A. Skalka: *J. Mol. Biol.*, 58, 417 (1971)
- 24) T. Okazaki, R. Okazaki: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 64, 1242 (1969)
- 25) 村松正実: 本誌, 17, 509 (1972)

別冊 蛋白質核酸酵素

ために一様なバックにするのは非常にむずかしい。とにかくぶつりゆえに写真に比べて変化に乏しいので、写真の仕上げには苦労する。トリミングによってゴミはさけ、少しの照射ムラなら優しい焼きによって除く。そのほかにもスケールを入れるため、コントラストを増すために一度フィルムを印画紙に焼きつけてからそれを接写するといふ。

具体的な手順を書くと、次のようになる。なるべくゴミのないきれいな細胞の核酸分子を見つけたら、照射ムラができないように充分照射ビームを拡げてシャッターを切る。フィルム上の現象は新しい現象を使っているのがコントラストがいい。現象中はよくかきまわって現象ムラができないようにする。印画紙はF5の一番高コントラストの紙を使い、照射ムラがあるようなら、明るいほうを引けし愚の下に手を添えて少しだけ覆ってそのムラをとるようにする。一枚のフィルムに対して10枚ぐらい焼きつけてみて一番よいものを選ぶ。ゴミがあったらそ

れをさけてトリミングする。倍率を計算してスケールを入れ、スライドを作るときに使うミニコピーフィルムで接写する。それをもう一度F5の引けし愚の下に焼きつけて、そのときまだムラが残っているようなら、また優しい焼きでそれをとる。

文 献

- 1) A. Kleinschmidt, D. Lang, D. Jackwerz, R. Zahn: *Biochim. Biophys. Acta*, 61, 837 (1982)
- 2) C. A. Thomas, Jr.: *J. Gen. Physiol.*, 49, 143 (1966)
- 3) D. Lang, H. Bujard, B. Wolf, D. Russell: *J. Mol. Biol.*, 23, 163 (1967)
- 4) 沼家基宏: 分子生物学講座 (日本生物物理学会編), 11, 338, 岩波書店, 京都 (1969)
- 5) D. Lang, A. K. Kleinschmidt, R. K. Zahn: *Biochim. Biophys. Acta*, 55, 142 (1964)
- 6) D. Lang, Michiko Mitani: *Biopolymers*, 9, 373 (1970)
- 7) C. N. Gordon, A. K. Kleinschmidt: *Biochim. Biophys. Acta*, 155, 305 (1968)
- 8) 沼家基宏: 本誌, 12, 541 (1967)

編 集

★ 本誌「蛋白質核酸酵素」も早いもので、誕生以来数えて18年。その間にあって、生化学および関連諸領域研究の変遷は他の分野と比較しても、まことに驚かす多岐。研究人脈も変わる。いきおい本誌も次たり小たり形々にその形と性格を変えていく。毎年1回雑誌にはさる選定読者カードを配付していても、また読者おそれる日得研究室を巡ったり、学会の取材時などからもその時々の雑誌への要望をうかがい知るのである。

“最近の雑誌をみてみると、たとえば「分化の生化学」とか「ヒストンの物理化学」とか、そうした設定が望ましい。常にフォード・バックする方向だね。また、‘個々の雑誌にその思考過程をいかに示すか’だね。さらにはある雑誌の編集後記ではお名さして、もっと生型に直結した扱いをしないとあの雑誌は今や学生さんには読められない、などどコソ評? もまされる。その他たくさん。一つ一つそうした要望とか批判を留意として雑誌に消化吸収をした上で、また新たな方向が見いだせばそれとよし。(U)

★ 昨年10月に上巻(RN&E)が刊行され、各方面からDNA 編も早くと編集をいただいたが、ようやくどうにか校了

後 記

の日となった。迅速な生命とする雑誌としての長所が生かされたかどうかについてはあまり自信がもてない。

校了ゲダを並べてみず感じることには、なんとなくさんの実験手技があるのだらうということだ。しかしこれでも重要な部分で抜けている項目がいくつもあることは確かである。とはいえ、この類の雑誌の刊行日というのは、大勢の執筆者の都合、出版社、印刷社の人の都合、営業面での都合など、さまざまな要素の集約された期日であるのだから、時間的に間に合わないといういたしかたない面もあるであろう。足りない点はいずれ本誌で補って行かなければならぬ。

編集にあたっては、なるべく具体的に、細かな注意、コソ、のようなものまで含めていただくようお願いした。勿論、このまき行なえば必ずうまくいくといった性質のものではないだろうが、かなり決定的な参考書としてお役にたつことを期待している。

本書編集委員の石浜明、岡崎金造、京阪好正、西村達也先生には、各段階で多大のご協力をいただいた。とりわけ忙がしい中を集中的に、全部のゲダを読んでいただくなどお骨折りで下された石浜先生に深くお礼申し上げます。(N)

別冊 蛋白質 核酸 酵素

昭和48年7月10日印刷

昭和48年7月20日発行

核酸実験法 下

編集人 笹山光陽

発行人 笹山正男

印刷人 大久保健児

印刷所 新日本印刷株式会社

東京都新宿区南ヶ谷本村町27

発行所 共立出版株式会社
東京都文京区小日町4丁目6番19号
電話 東京(947) 2511(代表)
振替口座 東京 57035

©1973

by Kyoritsu Shuppan Co., Ltd.
Publisher, 4-6-19, Kojimachi,
Bunkyo-ku, Tokyo

— 装 幀 篇 —
定価 1300 円 (送料 130 円)